

УДК 618.14-006.6+616-006.66:577.112

Н.В.Зелінська, О.П. Пересунько, І.С. Давиденко

**Цитохімічне визначення окислювальної модифікації білків при
аденокарциномі та плоскоклітинному раку шийки матки**

Буковинський державний медичний університет

м. Чернівці, Україна

Реферат: Вивчена ступінь окислювальної модифікації білків в цитохімічних препаратах шийки матки при плоскоклітинному зроговілому та незроговілому раках і аденокарциномі шийки матки. Отримані результати дають можливість рекомендувати цей метод в якості чутливого додаткового тесту диференційної діагностики.

Ключові слова: аденокарцинома, плоскоклітинний рак, шийка матки, окислювальна модифікація білків, цитохімія.

Вступ. Діагностика раку шийки матки (РШМ) має клінічний, епідеміологічний, морфологічний, імунологічний, біоклінічний та інші аспекти [7,8]. Вирішення цієї проблеми неможливе без використання морфологічних дослідницьких прийомів. Досить відзначити, що лише за допомогою морфологічних методів вдається виявити передракові зміни епітелію (дисплазію), внутрішньоепітеліальний і передклінічний інвазивний рак [3]. Бурхливий розвиток електронної мікроскопії, гісто- і цитохімії ще більше розширює можливості онкоморфологів у вивченні механізмів малігнізації і закономірностей розвитку пухлин [3,7,9].

Однак є підстави вважати, що проблема своєчасної діагностики раку шийки матки в Україні далека від вирішення. По-перше, смертність хворих протягом року від встановлення діагнозу втричі перевищує кількість випадків в IV стадії. По-друге, рак шийки матки належить до так званих «візуальних» локалізацій, для яких протягом багатьох десятиків років відомі засоби раннього виявлення.

За останні десятиріччя спостерігається збільшення захворюваності не тільки на плоскоклітинний, але й залозистий рак шийки матки, особливо

серед жінок молодого віку. Діагностика аденокарциноми шийки матки ще більше утруднена внаслідок невивченості захворювання та недостатнього досвіду морфологічної діагностики залозистих неоплазій [7,10].

Біля 80% всіх випадків РШМ складає плоскоклітинний рак, біля 20% - аденокарцинома. В розвинутих країнах спостерігається значне зниження захворюваності плоскоклітинним РШМ і смертності від цієї патології, що ймовірно пов'язано з ефективним скринінгом. В той же час захворюваність аденокарциномою шийки матки на протязі останніх 30 років збільшується, напевно внаслідок меншої ефективності цервікального цитологічного скринінгу і виявлення цього типу РШМ [1,2,11].

В світовій практиці поворотним пунктом у вирішенні проблеми раку шийки матки стало впровадження масових цитологічних обстежень шийки матки – цитологічного скринінгу [3,4,5], цінність якого доведена. Враховуючи доступність шийки матки, точний діагноз в більшості випадків встановлюється за допомогою цервікальної цитології, теста Папаніколау чи цервікальної біопсії. Методи цервікального цитологічного скринінгу ще менш ефективні в діагностиці аденокарциноми, так як аденокарцинома вражає ділянки шийки, з яких важче отримати матеріал (тобто цервікальний канал). Підвищити вірогідність виявлення раку, в тому числі аденокарциноми шийки матки, можуть новітні діагностичні заходи [2,7,12].

Ціллю нашого дослідження було показати діагностичну цінність цитохімічного визначення окислювальної модифікації білків (ОМБ) в епітелії цервікального каналу для діагностики та диференційної діагностики плоскоклітинного раку та аденокарциноми шийки матки.

Матеріали та методи дослідження. В нашому дослідженні проаналізовані морфологічні (мазок на цитологію шийки матки) дані хворих на патологію шийки матки: аденокарцинома шийки матки (n=19), плоскоклітинний рак (n=25), недиференційований рак (n=12), цитологічний контроль – пацієнтки з незміненим циліндричним епітелієм (n=15). Матеріалом для дослідження становили висушені нативні мазки з вмісту

каналу шийки матки та екзоцервіксу. У дослідженні були вивчені наступні групи: практично здорові жінки, аденокарцинома G1, G2, G3, плоскоклітинний рак незроговілий, плоскоклітинний рак зроговілий.

Для визначення ступеня окислювальної модифікації білків (ОМБ) використовували мікроспектрофотометричний комп'ютерний аналіз цифрових зображень на основі методики забарвлення бромфеноловим синім за Мікель-Кальво [8], яка полягала у наступному:

1. Цитологічні препарати протягом 2-10 хв. фарбують у розчині А (21 мл етанолу, 9 мл оцтової кислоти, 0,03 г бромфенолового синього або 56 мл етанолу, 24 мл оцтової кислоти, 0,08 г бромфенолового синього)

2. Диференціюють кожне скло окремо доти, поки не відійдуть жовто-зелені хмаринки фарби у розчині В (21 мл етанолу, дистильована вода 9 мл, оцтова кислота – 0,3 мл).

Цитологічні препарати за методикою Мікель-Кальво під дією оцтової кислоти руйнуються, тому визначення показника R/B в цитологічних препаратах проводиться за дещо модифікованою методикою за Давиденко, яка на даний час знаходиться на стадії патентування [6].

Оптичні зображення за допомогою цифрової фотокамери Olympus C-740UZ та мікроскопа ЛЮМАМ-8 (Об.20^x, Ок.10^x) переводили у цифрові, а останні аналізували за допомогою ліцензійної копії комп'ютерної програми ВидеоТест – Размер 5.0, виробника ООО Видеотест (Росія, 2000) шляхом зондової комп'ютерної мікроспектрометрії у системі аналізу кольору RGB (від англ.- Red, Green, Blue). Згідно до вказаної системи аналізу кольору, оцінювали інтенсивність червоного і синього кольору в забарвленні. Оскільки червоне забарвлення при методиці Мікель-Кальво відповідає карбонільним групам, а синє – аміногрупам білків, то шляхом встановлення математичного співвідношення між інтенсивністю забарвлення в двох кольорах (ділянки спектру) оцінювали ступінь ОМБ (співвідношення карбоксильних та аміногруп). Таким чином, ступінь ОМБ в цитоплазмі

епітелія цервікального каналу визначали за коефіцієнтом R/B (червоний/синій).

Для кожної вибірки перевіряли гіпотезу про нормальність розподілу за допомогою критерія Уїлки-Хана-Шапіро. Гіпотеза в жодному випадку не була відхилена, тому використовували параметричний метод порівняння – непарний двосторонній критерій Стюдента. Для прийняття чи відхилення статистичної гіпотези застосували рівень вірогідності $p=0,05$.

У мазках вмісту цервікального каналу, які пофарбовані бромфеноловим синім на «кислі» та «основні» білки за методом Мікель-Кальво, визначалися такі окремі об'єкти: епітеліальні клітини (непухлинні у практично здорових жінок або пухлинні при діагностиці пухлини), слиз (тобто безструктурні слизисті неклітинні маси), а також відмічалися об'єкти, які важко було з впевненістю віднести до якогось певного вищезазначеного типу об'єкта (неідентифіковані об'єкти мазків).

Результати дослідження. У всіх вищезазначених об'єктах на цитохімічних препаратах (мазки цервікального каналу), пофарбованих бромфеноловим синім на «кислі» та «основні» білки за методом Мікель-Кальво, був визначений коефіцієнт R/B. Середні величини цього коефіцієнту наведені у таблиці 1.

Таблиця 1.

Коефіцієнт R/B у цитохімічних препаратах (шийки матки)

№ з/п	Групи дослідження	Коефіцієнт R/B		
		У цитоплазмі епітеліальних клітин	У слизу	У неідентифікованих об'єктах мазків
1.	Практично здорові жінки	1,17±0,053	1,24±0,062	3,41±0,219
2.	Плоскоклітинний рак незроговілий	1,62±0,093 Рпз=0,004	1,38±0,096 Рпз>0,05	3,38±0,208 Рпз>0,05
3.	Плоскоклітинний рак зроговілий	3,28±0,241 Рпз<0,001 Рпнр<0,001	2,12±0,058 Рпз<0,001 Рпнр<0,001	3,52±0,193 Рпз>0,05 Рпнр>0,05
4.	Аденокарцинома G1	0,98±0,077 Рпз=0,049	0,94±0,106 Рпз=0,032	3,46±0,198 Рпз>0,05
5.	Аденокарцинома G2	0,97±0,075 Рпз=0,036	0,92±0,104 Рпз=0,024	3,43±0,206 Рпз>0,05Ф
6.	Аденокарцинома G3	0,74±0,084 Рпз=0,004	0,91±0,120 Рпз=0,021	3,45±0,218 Рпз>0,05

Примітка. Рпз – у порівнянні з практично здоровими жінками; Рпнр – у порівнянні з плоскоклітинним незроговілим раком.

Відповідно до даних таблиці, при аденокарциномах різного ступеня диференціювання коефіцієнт R/V в атипових (пухлинних) клітинах у середньому є нижчим, ніж у практично здорових. При цьому в атипових клітинах аденокарциноми G3 він є особливо низьким, що важливо для диференційної діагностики ступенів диференціювання аденокарцином. У той же час, коефіцієнт R/V є більшим, ніж у практично здорових при плоскоклітинних формах раку, особливо при зроговілій формі.

Щодо слизу, то необхідно відзначити, що його дослідження також показало закономірні зміни. Зокрема, при аденокарциномах коефіцієнт R/V у слизу був нижчим, ніж у практично здорових, але різниці між ступенями диференціювання цієї пухлини не виявлено. При плоскоклітинних формах раку коефіцієнт R/V у слизу навпаки був вищим, ніж у практично здорових і особливо значні цифри відмічені для зроговілої форми плоскоклітинного раку. Пояснити високі цифри щодо коефіцієнту R/V при плоскоклітинних раках можна тим, що, можливо до складу слизу домішуються залишки пухлинних клітин.

На нашу думку, визначення ОМБ в слизу має також неабияке діагностичне значення так, як це може стати новим поштовхом діагностики так званих «порожніх» (без наявності епітелія) цитологічних мазків [3,10].

У неідентифікованих об'єктах нативних мазків вмісту цервікального каналу зафіксовані найбільш високі середні величини коефіцієнту R/V, причому це спостерігалось у всіх групах дослідження приблизно на одному рівні. Остаточний висновок щодо неідентифікованих об'єктів мазків вмісту цервікального каналу робити важко, але можна припустити, що неідентифікованими об'єктами в основному є клітини у стані некрозу (що властиво пухлинам) або апоптозу (що властиво як пухлинним клітинам так і клітинам без ознак пухлинної атипії). У всякому разі варто зауважити, що неідентифіковані об'єкти не мають значення для діагностики пухлин та їх диференціювання, але при великій їх кількості можуть призвести до хибних

висновків, якщо їх враховувати в загальній масі, а не виділяти як окремий параметр дослідження.

Висновок. Діагностику раку шийки матки (плоскоклітинного та аденокарциноми) доцільно доповнювати поряд з традиційними морфологічними дослідженнями, проведенням цитохімічного визначення окислювальної модифікації білків.

Література

1. Аденокарцинома шейки матки / С.А Саргсян, В.В. Кузнецов, М.А. Шабанов и др. // Вестник РОНЦ им.Н.Н. Блохина РАМН. – 2006.-Т.17, №3. – С.37-39.
2. Аденокарцинома шейки матки / Г.А. Франк, Ю.Ю. Андреева, Л.Э. Завалишина, А.Н. Петров // Архив патологии.- 1999.- №5 том 61.
3. Бохман Я.В. Руководство по онкогинекологии. / Я.В. Бохман //– С-Пб.: Фолиант.- 2002.
4. Вакуленко Г.А. Ключевые звенья патогенеза рака шейки матки, определяющие клинические перспективы./ Г. Вакуленко, Е. Манжура, И. Щепотин // Здоровье женщины.- 2006.-№2.-С.202-206.
5. Ганина К.П. Диагностика предопухолевых и опухолевых процессов шейки матки / К.П. Ганина, Е.В. Коханевич, А.Н. Мельник // – Киев: Наук.думка.- 1984. – 180с.
6. Давиденко І.С. Спосіб вимірювання окиснювальної модифікації білків в структурах плаценти / І.С.Давиденко, О.П. Шендерюк // Деклараційний патент України на винахід №13712 U.- 17.04.2006.- Бюл. №4.- 2с. (заявл. 14.10.2005, №u200509673, БДМУ).
7. Заболевания шейки матки (клинические лекции) \под.ред. В.Н. Прилепской // Москва:» МедиаСфера», 1997. – 88с.;
8. Окислювальна модифікація білків епітелію та волокнистого компонента стромы шийки матки залежно від стану ендометрію. / Бозан Адель Бакко, О.П. Пересунько, І.С. Давиденко // Збірник наукових праць «Актуальні

проблеми акушерства і гінекології, клінічної імунології та медичної генетики», Київ – Луганськ, 2011 р. Випуск 21, с. 122-128.

9. Э. Пирс. Гистохимия (теоретическая и прикладная). / Э. Пирс // . – М.: Издательство иностранной литературы.- 1962. – 747 с.

10. Adenosquamous histology predicts poor outcome in low-risk stage IB1 cervical adenocarcinoma / J.S. Lea, R.L. Coleman, E.O. Garner, L.R. Duska et al.// Gynecol Onco.-2003.-Vol.91.-P.558-562

11. American, Cancer Society. Cancer facts & figures 2007. Atlanta, - 2007.

12. FIGO 26th annual report on the results of treatment in gynecological cancer.- 2006

Н.В.Зелинская, А.П. Пересунько, И.С. Давыденко

**Цитохимическое определение окислительной модификации белков
при аденокарциноме и плоскоклеточном раке шейки матки**

Буковинский государственный медицинский университет

г. Черновцы, Украина

Реферат: изучена степень окислительной модификации белков в цитохимических препаратах шейки матки при плоскоклеточном ороговевающем и неороговевающем раке и аденокарциноме шейки матки. Полученные результаты дают возможность рекомендовать этот метод в качестве чувствительного дополнительного теста дифференциальной диагностики железистого и плоскоклеточного рака шейки матки.

Ключевые слова: аденокарцинома, плоскоклеточный рак, шейка матки, окислительная модификация белков, цитохимия.

N.V. Zelinska, A.P. Peresun'ko, I.S. Davydenko

**Cytochemical determination of oxidative modification of proteins in
adenocarcinoma and squamous cervical cancer**

Bukovinian State Medical University

Chernivtsi, Ukraine

Abstract: The degree of oxidative modification of proteins in cytochemical preparations for cervical squamous keratinized and nonkeratinized cancers and adenocarcinoma of the cervix. Has been studied obtained the results allow to recommend this method as a sensitive test of additional differential diagnosis of glandular and squamous cervical cancer.

Keywords: adenocarcinoma, squamous cell carcinoma, cervix, oxidative modification of proteins, cytochemistry.